

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

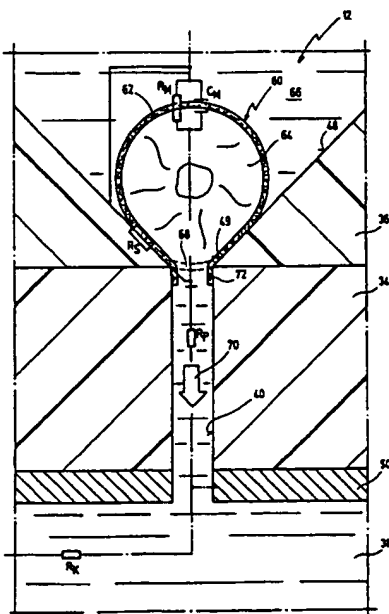
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27614 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/487, 27/403
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08895
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2000 (12.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 48 473.2 8. Oktober 1999 (08.10.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UND MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN [DE/DE]; Markwiesenstrasse 55, 72770 Reutlingen (DE). BAYER AG [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NISCH, Wilfried [DE/DE]; Bismarckstrasse 20, 72072 Tübingen (DE). STELZLE, Martin [DE/DE]; Rosnetstrasse 20/6, 72776 Reutlingen (DE). STETT, Alfred [DE/DE]; Matheus-Wagner Strasse 43/4, 72768 Reutlingen (DE). KRAHN, Thomas [DE/DE]; Wiener Strasse 29, 58135 Hagen (DE). MÜLLER, Thomas [DE/DE]; Rilkestrasse 86, 53225 Bonn-Beuel (DE). METHFESSEL, Christoph [DE/DE]; Kirchhofstrasse 94, 42327 Wuppertal (DE).
- (74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; White, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TAKING MEASUREMENTS OF CELLS WHICH ARE CONTAINED IN A LIQUID ENVIRONMENT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM MESSEN AN IN EINER FLÜSSIGEN UMGEBUNG BEFINDLICHEN ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method and a device for taking measurements of cells (60) which are contained in a liquid environment (66). According to the invention, the underside (68) of the membrane (62) of each cell (60) is positioned on a surface (48), said surface (48) being penetrated by a channel (40), in which a negative pressure (70) is created in order to attach the cell (60) by suction. The cell (60) is also electrically interrogated via at least one electrode (50), which is positioned at a distance from the cell (60). The negative pressure (70) is preferably set to pulse, in order to open the membrane (62) so that a connection is formed between the cell interior (64) which is surrounded by the membrane (62) and the channel (40).

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren und eine Vorrichtung dienen zum Messen an in einer flüssigen Umgebung (66) befindlichen Zellen (60), bei dem jede Zelle (60) mit einer Unterseite (68) ihrer Membran (62) auf einer Oberfläche (48) positioniert wird, wobei die Oberfläche (48) von einem Kanal (40) durchsetzt ist, in dem zum Ansaugen der Zelle (60) ein Unterdruck (70) eingestellt wird. Die Zelle (60) wird ferner über mindestens eine Elektrode (50) elektrisch abgefragt, die von der Zelle (60) beabstandet angeordnet ist. Der Unterdruck (70) wird vorzugsweise zum Aufreißen der Membran (62) pulsartig eingestellt, so daß das von der Membran (62) umschlossene Zellinnere (64) mit dem Kanal (40) verbunden wird.

WO 01/27614 A1



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren und Vorrichtung zum Messen an in einer
flüssigen Umgebung befindlichen Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Messen an in einer flüssigen Umgebung befindlichen Zellen, bei dem jede Zelle mit einer Unterseite ihrer Membran auf einer Oberfläche positioniert wird, wobei die Oberfläche von mindestens einem Kanal durchsetzt ist, in dem zum Ansaugen der Zelle an die Oberfläche ein Druckgefälle eingestellt wird und ferner die Zelle über mindestens einer Elektrode elektrisch abgefragt wird.

Die Erfindung b trifft ferner eine Vorrichtung zum elektrischen Messen an in flüssiger Umgebung befindlichen Zellen, mit einem Substrat, das von einem Kanal durchsetzt ist, oberhalb dessen eine Zelle mit ihrer Unterseite ihrer Membran auf einer Oberfläche des Substrates positionierbar ist, wobei Mittel zum Erzeugen eines Druckgefälles entlang des Kanals vorgesehen sind und eine erste Elektrode zur elektrischen Abfragung der Zelle vorgesehen ist.

Ein Verfahren und eine Vorrichtung der vorstehend genannten Art sind aus der DE 197 12 309 A1 bekannt.

Es ist bekannt, zum Untersuchen von biologischen Zellen sogenannte Mikroelektrodenanordnungen einzusetzen. Die Mikroelektrodenanordnungen dienen dabei z.B. zum Stimulieren der Zellen oder zum Ableiten von Potentialen. Die Untersuchungen können dabei in einer biologischen Umgebung durchgeführt werden oder auch in einer artifiziellen Umgebung. Die Anordnungen umfassen hierzu in einem Trägerkörper eine Vielzahl von Mikroelektroden, deren Abmessungen etwa in der Größenordnung der Zellen liegen, also im Bereich von einigen μm bis einigen zehn μm . Eine Mikroelektrodenanordnung dieser allgemeinen Art ist z.B. aus der WO 97/05922 bekannt.

Bei herkömmlichen Mikroelektrodenanordnungen ist man mehr oder weniger auf den Zufall angewiesen, ob die eine oder die andere Zelle sich auf einer bestimmten Elektrode niederläßt oder nicht. In der Praxis lassen sich die Zellen im allgemeinen nur unter teilweiser Überdeckung auf einer Elektrode nieder, so daß die Stimulation der Zelle bzw. die Ableitung eines Zellpotentials auf diese Teilfläche beschränkt ist. Darüber hinaus sitzen

die Zellen nur lose auf den Elektroden auf. Dies kann zu Problemen hinsichtlich des Abdichtwiderstandes zur Referenzelektrode führen. Auch können Zellen außerhalb des Bereichs einer Elektrode zu liegen kommen, so daß sie bei der Messung nicht erfaßt werden.

Bei der aus der eingangs genannten DE 197 12 309 A1 bekannten Mikroelektrodenanordnung werden diese Nachteile dadurch vermieden, daß die Zellen in Mikroküvetten eingefangen werden, an deren Boden sich eine Elektrode befindet. Die Elektrode ist mit einem zentralen Kanal versehen, in dem über geeignete Verbindungskanäle, die unterhalb der Elektroden verlaufen, ein Unterdruck erzeugt werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, einzelne Zellen zielgerichtet an die Elektroden heranzuziehen und sie unter einem gewissen Kontaktdruck auf den Elektroden zu fixieren. Es können dann Messungen an den Elektroden, jedoch nur von deren Außenseite her, durchgeführt werden.

Aus einem anderen Fachgebiet, der sogenannten Patch-Clamp-Technik, ist es bekannt, Zellen an einer Pipette mit Unterdruck anzusaugen (vgl. US-Z "NATURE", Vol. 260, Seiten 799-801, 1976). Bei der Patch-Clamp-Technik muß jedoch die Pipette gezielt an eine einzelne Zelle herangeführt werden. Bei der Patch-Clamp-Technik werden die zu kontaktierenden Zellen nicht bewegt, da sie in der Regel an einem Substrat anhaften. Das herkömmliche Kontaktieren von Zellen mit Patch-Clamp-Pipetten hat jedoch den Nachteil, daß die Anzahl gleichzeitig kontaktierbarer Zellen äußerst beschränkt ist, da aus Platzgründen nicht beliebig viele Pipetten in die Kulturkammer eingeführt werden können.

Die Patch-Clamp-Technik hat andererseits gegenüber der weiter oben beschriebenen Technik, bei der lediglich von der Außenseite der Zelle her Messungen möglich sind, den Vorteil, daß das Zellinnere in die Messung mit einbezogen werden kann.

Bei der konventionell angewandten Patch-Clamp-Technik mit Einzelpipetten wird dies unter mikroskopischer Beobachtung dadurch bewirkt, daß eine fragile Glaspipette mittels eines Mikromanipulators an eine auf einem Substrat haftende einzelne Zelle herangeführt und die Membran vorsichtig an die Pipettenöffnung angesaugt wird. Es besteht daher ein direkter Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche. Dadurch wird ein Membranfleck gegenüber der umgebenden Flüssigkeit abgedichtet und elektrisch isoliert. Diese Isolation wird auch als "Gigaseal" bezeichnet. Von dieser "Cell-Attached-Konfiguration" gelangt man zur sogenannten "Whole-Cell-Konfiguration", indem man die abgedichtete Membran weiter angesaugt. Dies geschieht derart, daß das Membranstück unterhalb der Pipette durchbrochen wird. Auf diese Weise entsteht ein hydraulisch und elektrisch abgedichteter Zugang über die Pipettenöffnung zum Zellinneren. Die restliche Zellmembran ist damit als Ganzes elektrisch zugänglich (sogenannter "whole cell patch"). Die Anwendung dieser herkömmlichen Methode erfordert jedoch ein gehöriges Maß an Erfahrung und Fingerspitzengefühl. Mehrere Zellen können nur sequentiell bearbeitet werden. Diese Methode ist daher ungeeignet für Massenerhebungen, wie sie z.B. im Bereich des Pharmascreeing, des Substanzscreening und dergleichen erforderlich wären.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung der eingangs genannten Art dahingehend weiterzubilden, daß die vorstehend genannten Nachteile vermie-

d n werden. Insbesondere soll die Erfindung möglichst konsistente Messungen vorzugsweise parallel an einer Mehrzahl von Zellen ermöglichen, insbesondere wie es im Bereich des experimentellen und anwendungsorientierten Screenings der Wirkung von pharmazeutischen Wirkstoffen auf zellulärer Ebene gewünscht wird.

Bei einem Verfahren gemäß der eingangs genannten Art wird diese Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Unterseite der Membran durch eine Erhöhung des Druckgefälles aufgerissen wird und/oder die Membran durch Zugabe von porenbildenden Substanzen oder durch einen elektrischen Stromimpuls mikroporös und elektrisch niederohmig gemacht wird oder aufgerissen wird.

Bei einer Vorrichtung gemäß der eingangs genannten Art wird die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe dadurch gelöst, daß mindestens eine zweite Elektrode von der ersten Elektrode in Richtung des Kanals beabstandet angeordnet ist.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfindung ermöglicht es, im Vergleich zu herkömmlichen Patch-Clamp-Techniken, auf das diffizile Manipulieren einer fragilen Glaspipette zu verzichten, da die Funktion der herkömmlichen Glaspipette durch den Kanal in einem Substrat ausgeübt wird, an den ein Unterdruck angelegt wird, um eine Cell-Attached-Konfiguration einzustellen. Hat sich auf diese Weise ein Megaseal zwischen der Zellwand und der Oberfläche, an die die Zelle angesaugt wird, eingestellt, so wird erfindungsgemäß entweder die Unterseite der Membran durch eine Erhöhung des Un-

terdrucks aufgerissen, so daß nunmehr Messungen über den Kanal durch das von der Membran umschlossene Zellinnere durchgeführt werden können. Alternativ oder zusätzlich hierzu kann die Membran durch Zugabe von porenbildenden Substanzen mikroporös und elektrisch niederohmig gemacht werden. Durch die Zugabe solcher porenbildender Substanzen, wie etwa Nystatin oder Amphotericin B, werden in der Membran Poren gebildet, so daß ein niederohmiger Zugang zum Zellinnern ermöglicht wird, durch den jedoch keine größeren Moleküle diffundieren können. Somit können die resultierenden Membranströme gemessen werden, ohne daß hierzu die Unterseite der Membran zerstört werden muß. Alternativ kann die Membran in diesem Bereich auch durch einen kurzzeitigen elektrischen Impuls durchlässig gemacht werden oder aufgerissen werden.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung liegt darin, daß die Meßelektrode räumlich entfernt von der Membran angebracht werden kann, so daß die Zelle nicht mit ihrer Membran unmittelbar auf der Elektrode aufliegt, sondern die Messung über das intrazelluläre Medium erfolgt.

Während bei der bekannten Anordnung gemäß der DE 197 12 309 A1 nur extrazelluläre Messungen möglich sind, d.h. Messungen von durch Membranströme hervorgerufenen Potentialänderungen in unmittelbarer Umgebung der Zelle, können erfindungsgemäß intrazelluläre und extrazelluläre Messungen durchgeführt werden, d.h. es kann die über die Membran hinweg anliegende Spannung gemessen und kontrolliert werden. Bevorzugt wird zu diesem Zweck ein Strom in die Membran injiziert.

Die Erfindung eignet sich daher in besonderem Maße für Massenuntersuchungen im Bereich des Pharmascreeing und des Substanzscreening, der Identifizierung von Klonen (GVO's; genetisch veränderte Organismen) und im Rahmen von Substanzoptimierungen, wobei das Zytoplasma biologischer Zellen elektrisch gemessen wird, und zwar gleichzeitig oder unmittelbar sequentiell für eine Vielzahl derartiger Zellen. Die Erfindung eröffnet daher erstmalig die Möglichkeit, eine Technik mit denselben Vorteilen herkömmlicher Patch-Clamp-Techniken in vollautomatisierter Weise einzusetzen. Es können daher viele derartige Zellen parallel, automatisierbar und mit hohem Durchsatz untersucht werden.

In bevorzugter Weiterbildung der Erfindung wird das Druckgefälle zum Aufreißen der Membran pulsartig erhöht.

Durch diese Maßnahme wird es ermöglicht, auf kontrollierte Weise von der Cell-Attached-Konfiguration zur Whole-Cell-Konfiguration zu gelangen.

Grundsätzlich ist es möglich, eine Mehrzahl von Kanälen in einem gemeinsamen Substrat vorzusehen und mit Hilfe des Unterdruckes Zellen an die Oberfläche des Substrates an den Mündungen der Kanäle anzusaugen.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung wird die Zelle jedoch auf dem Boden einer Mikroküvette positioniert.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß in kontrollierter Weise über jedem Kanal ein flüssiges Medium mit einer Pipette oder dergleichen eingebracht werden kann, das die zu untersuchenden Zellen beinhaltet. Auf diese Weise kann eine große Anzahl von

Mikroküvetten, die sich in einem gemeinsamen Träger befinden, gleichzeitig über je einen einer Mikroküvette zugeordneten Kanal und zumindest je eine Meßelektrode gemessen werden.

Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem als Meßgröße des elektrischen Signals der Strom (I_{sc}) durch das Zellinnere der Zelle verwendet wird und/oder das elektrische Potential an den Elektroden gemessen wird.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Zelle über eine Elektrode, die in Richtung des Kanals von der Unterseite der Membran beabstandet ist, elektrisch abgefragt. Hierzu kann ein Strom in das Zellinnere injiziert werden.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß ein direkter elektrischer Zugang nur in das Innere der Zelle hergestellt wird. Dadurch, daß die Zelle mit ihrer Außenmembran dicht auf dem Boden der Mikroküvette aufliegt und dort sogar mittels Unterdruck fixiert wird, entsteht in automatisierter Weise der aus der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik bekannte Gigaseal, d.h. ein extrem hoher und daher die Messung wenig beeinflussender Leckwiderstand zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärmedium. Dadurch, daß die Elektrode sich räumlich entfernt vom Gigaseal befindet, ist ferner gewährleistet, daß die Zelle selbst nur mit elektrisch isolierenden Materialien in Verbindung kommt, so daß die Aufrechterhaltung des Gigaseals gewährleistet ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in einer Anordnung mit einer Vielzahl von Kanälen der Druckimpuls oder der elektrische Stromimpuls

gleichzeitig an alle Kanäle angelegt. Es ist jedoch alternativ auch möglich, die Druckimpulse bzw. Stromimpulse nacheinander an einzelne ausgewählte Kanäle anzulegen, sei es in beliebiger Reihenfolge oder in streng sequentieller Vorgehensweise.

Diese Maßnahmen haben den Vorteil, daß nahezu beliebige Experimente an einer Vielzahl von Zellen automatisiert ausgeführt werden können, so daß sehr viele Meßergebnisse pro Zeit erzielt werden.

In bevorzugter Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Zusammensetzung des intrazellulären flüssigen Mediums nach dem Öffnen der Membran oder der Erzeugung von Mikroporen durch Zugabe von Substanzen verändert oder das intrazelluläre flüssige Medium ausgetauscht. Hierzu kann der Kanal mit zwei oder mehr getrennten Verbindungskanälen verbunden werden, wobei einer mit Elektrolyt gefüllt wird, der in seiner Zusammensetzung derjenigen des Zytoplasmas (Intrazellulärflüssigkeit) ähnelt oder eine spezielle Flüssigkeit mit Wirkstoffzusätzen ist.

Auf diese Weise wird eine gezielte und kontrollierte Beeinflussung des intrazellulären Mediums ermöglicht und gleichzeitig das mögliche Spektrum von durchführbaren Messungen erheblich vergrößert.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist mindestens eine zweite Elektrode von der ersten Elektrode in Richtung des Kanals beabstandet angeordnet.

In bevorzugter Weiterbildung sind Mitt 1 zur Steuerung des Druckgefälles vorgesehen, sowohl zur Erzeugung eines statischen Druckgefälles zur Einstellung einer Cell-Attached-Konfiguration, als auch zur pulsartigen Erhöhung des Druckgefälles zum Aufreißen der Unterseite der Membran.

Auf diese Weise kann einerseits die Einstellung des Megaseals auf zuverlässige und kontrollierte Weise erreicht werden und andererseits der Megaseal aufrechterhalten werden, während durch einen kurzen Druckimpuls die Unterseite der Membran aufgerissen wird und sich an die Kanalwandung anlegt. Dabei ist die Steuerung vorzugsweise so ausgelegt, daß der statische Unterdruck ständig aufrechterhalten wird (Offset-Druck), so daß der Megaseal auch bei der Whole-Attached-Konfiguration aufrechterhalten wird.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Elektrode an dem von der ersten Elektrode abgewandten Ende des Kanals angeordnet.

Dabei kann die Elektrode das abgewandte Ende des Kanals ringförmig umgeben.

Diese Maßnahmen haben den Vorteil, daß die Elektrode in einfacher Weise in eine Mikrostruktur integriert werden kann, indem sie auf der Unterseite der Schicht ausgebildet wird, in der der Kanal verläuft.

Bei einer anderen Variante der Erfindung ist die Elektrode hingegen im Abstand vom abgewandten Ende des Kanals angeordnet.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Elektrode, wie noch zu erläutern sein wird, gegenüber dem Kanal auch beweglich angeordnet sein kann, so daß mit derselben Elektrode nacheinander mehrere Zellen vermessen werden können.

Gemäß einem weiteren Merkmal der Erfindung ist der Kanal an seinem der ersten Elektrode abgewandten Ende über Ventile mit einer Mehrzahl von Kanälen verbunden, über die Flüssigkeit zu- oder abführbar ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß durch entsprechende Kontrolle der Druckverhältnisse in den Verbindungskanälen das Zellinnere nach Ausbildung der Whole-Cell-Konfiguration, d.h. nach Durchbrechen der Membran, mit Intrazellulär-Flüssigkeit in Kontakt kommt.

In zusätzlicher Weiterbildung der Erfindung ist über dem Substrat eine Mikroküvette angeordnet, in deren Boden eine Öffnung vorgesehen ist.

Auf diese Weise läßt sich die Flüssigkeit in einer insbesondere für Massenuntersuchung geeigneten Weise oberhalb des Substrates speichern, indem der Kanal oder die Kanäle vorgesehen sind. Hierbei können die Zellen durch eine geeignete trichterförmige Ausbildung der Mikroküvette unmittelbar bis in die Nähe einer Kanalmündung einer Substratoberfläche geführt werden. Auf alternative Weise kann die Öffnung im Boden der Mikroküvette jedoch auch einen deutlich größeren Durchmesser haben, so daß eine Führung der Zelle bis zur Mündung des Kanals im wesentlichen durch den angelegten Unterdruck erreicht wird. Dies erleichtert die Herstellung der erfindungsgemäßen Struktur.

Ferner ist es bevorzugt, eine Vielzahl von Kanälen in einem gemeinsamen Substrat anzuordnen.

Hierdurch ist eine kompakte Bauweise bei einfacher Herstellung erreichbar.

Dabei sind ferner bevorzugt eine Vielzahl von Mikroküvetten in einer Platte angeordnet.

Hierdurch ergibt sich der Vorteil, daß parallele oder sequentielle Messungen an vielen Zellen in einfacher Weise vorbereitet werden können, weil sich alle Mikroküvetten in einer gemeinsamen Platte befinden.

Bei Ausführungsformen der Erfindung, die eine gemeinsame Platte für die Mikroküvetten verwenden, ist weiterhin bevorzugt, wenn die Platte mehrschichtig aufgebaut ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, den unterschiedlichen Anforderungen an die verschiedenen Elemente der Platte durch geeignete Werkstoffwahl Rechnung tragen zu können.

Dies gilt insbesondere dann, wenn bei einer Fortbildung dieser Variante die Platte eine obere Schicht, eine mittlere Schicht und eine Unterschicht umfaßt, wobei in der oberen Schicht die Mikroküvetten angeordnet sind, die mittlere Schicht das Substrat mit den Kanälen bildet und in der Unterschicht Verbindungskanäle, die zu den Kanälen führen, angeordnet sind, sowie in einer bevorzugten Ausführungsform elektrische Zuleitungen, die zu den Kanälen führen, und Mikroelektroden angeordnet sind.

Diese Dreiteilung der Platte hat den Vorteil, daß für die drei wesentlichen Funktionen jeweils einzelne Schichten unterschiedlicher Dicke und unterschiedlicher Materialien eingesetzt werden können.

Gemäß einer weiteren Ausführung der Erfindung ist das Substrat mit einer Unterschicht verbunden, die aus einer oder mehreren Schichten aus photostrukturierbaren Materialien besteht, die eine räumliche Führung von Verbindungskanälen erlauben, die zu den Kanälen führen.

Hierbei kann die Unterschicht auf einen Glasträger aufgebracht sein.

Durch diese Maßnahmen wird eine besonders kompakte Bauweise und eine einfache Herstellung ermöglicht. Als photostrukturierbare Materialien sind bestimmte Polymere, aber auch bestimmte Gläser bekannt.

Es ist bevorzugt, wenn die Verbindungskanäle eine Breite zwischen 10 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 20 μm aufweisen.

Die Kanäle selbst haben bevorzugt eine lichte Weite von weniger als 10 μm , vorzugsweise von weniger als 5 μm .

Diese Maße haben sich im vorliegenden Zusammenhang als optimal erwiesen. Insbesondere wird dadurch, daß die lichte Weite der Kanäle geringer als der Zelldurchmesser ist, die Positionierung je einer Zelle auf einem Kanal unterstützt.

Wie bereits weiter oben angedeutet wurde, ist bei diesen Ausführungsformen der Erfindung besonders bevorzugt, wenn die Elektroden auf der Unterseite der mittleren Schicht oder der Oberseite der Unterschicht angeordnet sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Elektroden samt ihren Zuleitungen durch einfaches Aufdrucken, Abscheiden, Aufdampfen und nachfolgende Mikrostrukturierung durch bekannte Verfahren (Photolithographie, Ätzverfahren, lift-off etc.) ausgebildet werden können.

Es ist in diesem Fall weiter bevorzugt, wenn die Elektroden in Draufsicht als quadratische Fläche mit einer Kantenlänge zwischen 20 μm und 60 μm , vorzugsweise etwa 40 μm ausgebildet sind.

Wie bereits erwähnt, kann in diesem Fall vorgesehen sein, die zu den Elektroden führenden Leiterbahnen zwischen der mittleren und der unteren Schicht anzuordnen. Dies kann alternativ dadurch geschehen, daß sie unten auf die mittlere oder oben auf die Unterschicht aufgetragen werden. Ein Auftrag auf die Unterseite der mittleren Schicht hat den Vorteil, daß die Leiterbahnen zusammen mit den Elektroden ausgebildet werden können, insbesondere auch mit demselben Werkstoff, insbesondere Edelmetall, vorzugsweise Gold.

Die Leiterbahnen haben dabei vorzugsweise eine Breite zwischen 5 μm und 30 μm , insbesondere etwa 10 μm .

Wie bereits erwähnt wurde, können bei einer mehrschichtigen Bauweise der Platte unterschiedliche Werkstoffe für die einzelnen Schichten verwendet werden.

Die verschiedenen Schichten können z.B. unabhängig voneinander aus Kunststoff, aus Polymethylmethacrylat (PMMA), Silikon, PTFE, Polyimid oder aus einem anorganischen Material, insbesondere aus Glas, Keramik oder Silizium hergestellt werden.

Für das Substrat wird vorzugsweise Polyimid verwendet, das zu diesem Zweck als Folie eingesetzt wird, in der die Kanäle als Bohrungen ausgebildet sind. Das Substrat (die Folie) hat dann vorzugsweise eine Dicke zwischen 2 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 5 μm .

Für die untere Schicht wird vorzugsweise Glas verwendet. Im Glas, das in nahezu beliebiger Dicke zur Verfügung gestellt werden kann, um auf diese Weise auch die mechanische Stabilität sicherzustellen, können die notwendigen Verbindungskanäle und dergleichen in herkömmlicher Weise ausgebildet werden.

In zusätzlicher Weiterbildung der Erfindung ist es bevorzugt, das Substrat an der Unterseite einer Platte anzuordnen, in der eine Mehrzahl von Bohrungen als Mikroküvetten ausgebildet ist, in deren Boden Löcher vorgesehen sind, mit denen die Kanäle des Substrates zentriert sind.

Auf diese Weise läßt sich ein kombinierter Körper mit einer Vielzahl von Mikroküvetten, denen einzelne Kanäle und Elektroden zugeordnet sind, auf relativ einfache Weise herstellen.

Gemäß einer weiteren Ausführung der Erfindung ist ein Hydraulik- und Meßeinheit vorgesehen, die eine zur Unterseite des Substrates hin offene Kammer aufweist, die an der Unterseite des Substrates derart positionierbar ist, daß die Kammer mit einem ausgewählten Kanal kommuniziert und nach außen abgedichtet ist, wobei die Kammer mindestens eine Elektrode enthält und mit mindestens einem Anschlußkanal verbindbar ist, der mit einer Unterdruckquelle verbunden ist.

Dabei kann ferner eine Verfahreinheit zum Verfahren und Positionieren der Platte und der Unterdruck- und Meßeinheit relativ zueinander vorgesehen sein.

Auf diese Weise kann eine einzige Meßeinheit zur sequentiellen Vermessung einer Vielzahl von Zellen verwendet werden, wodurch sich eine erhebliche Kostenersparnis ergeben kann.

Dabei können bevorzugt handelsübliche, herkömmliche Normrasterplatten (sogenannte "96-Loch-Platten", "384-Loch-Platten" oder ähnliche) verwendet werden. Diese brauchen lediglich nach unten hin durch das Aufbringen der mit Kanälen (Löchern) versehenen Folie abgeschlossen zu werden. Die Messungen an den vielen einzelnen Zellen in den Bohrungen der Lochplatte werden nachfolgend sequentiell durch Verfahren der Unterdruck- und Meßeinheit oder umgekehrt durch Verfahren der Normrasterplatten in bezug auf eine feststehende Unterdruck- und Meßeinheit durchgeführt. Diese erzeugt den Unterdruckimpuls zum Öffnen der Zelle und enthält auch die Elektrode, um die anschließende Messung durch das Zellinnere durchzuführen.

Hierbei kann wiederum, wie zuvor bereits erwähnt, die Kammer mit einer Mehrzahl von Anschlußkanälen über Ventile verbunden sein, um so das Zellinnere nach Ausbildung der Whole-Cell-Konfiguration mit Intrazellulärflüssigkeit in Kontakt zu bringen oder die Zusammensetzung der Intrazellulärflüssigkeit verändern zu können.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 eine äußerst schematisierte perspektivische Ansicht eines Ausführungsbeispiels einer erfindungsgemäßen Vorrichtung;
- Fig. 2 einen Schnitt durch eine Mikroküvette der Anordnung gemäß Fig. 1, ebenfalls stark schematisiert;
- Fig. 3 eine Draufsicht auf die Mikroküvette gemäß Fig. 2, in leicht verkleinertem Maßstab;

- Fig. 4 einen Ausschnitt aus Fig. 2, in weiter vergrößertem Maßstab, zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens;
- Fig. 5 eine Darstellung, ähnlich Fig. 3, darstellend den Stand der Technik;
- Fig. 6 eine perspektivische Ansicht sowie einen vergrößerten Ausschnitt daraus, eines weiteren Ausführungsbeispiels einer erfindungsgemäßen Vorrichtung; und
- Fig. 7a)
bis 7c) verschiedene Phasen beim Ansaugen einer Zelle, der Ausbildung einer Cell-Attached-Konfiguration und einer Whole-Cell-Konfiguration bei Verwendung von zwei Verbindungskanälen zu dem Kanal, in vereinfachter, schematischer Darstellung.

Beispiel 1

In den Figuren 1 bis 4 ist mit 10 eine Platte bezeichnet. In einer Oberfläche 11 der Platte 10 ist durch Abformen ein Raster von Mikroküvetten 12 ausgebildet. Die Mikroküvetten 12 sind dreidimensional und haben für die Kultur von Zellen geeignete Abmessungen. In einer Platte 10 können z.B. $8 \times 12 = 96$ Mikroküvetten 12 angeordnet sein.

Mit einem Pfeil 14 ist angedeutet, daß die Mikroküvetten 12 von oben befüllt werden können, und zwar mit einer Flüssigkeit, in der sich zu untersuchende Zellen befinden. Es ist dabei mög-

lich, die Mikroküvetten 12 jeweils individuell mit unterschiedlichen Flüssigkeiten und Zellen zu befüllen.

Zum Ausführen der Messungen ist ein elektrisches Anschlußmodul 16 vorgesehen, das seitlich an die Platte 10 angedockt werden kann, wozu eine ausreichende Vielzahl von Steckern 18 vorgesehen ist. Die Stecker 18 stehen mit einem Netz von Leiterbahnen in Verbindung. Diese Leiterbahnen führen zu Elektroden, die im Bereich der Mikroküvetten 12 angebracht sind, wie dies noch erläutert werden wird. Vom elektrischen Anschlußmodul führt eine Datenleitung 20 zu einem Steuergerät 22.

Weiterhin ist ein hydraulisches Anschlußmodul 24 vorgesehen, das ebenfalls seitlich an die Platte 10 angedockt werden kann, und zwar mittels einer entsprechenden Vielzahl hydraulischer Stecker 26. Über das hydraulische Anschlußmodul 24 kann in vorbestimmter Weise, insbesondere individuell, unterhalb der Mikroküvetten 12 ein Unterdruck erzeugt werden, insbesondere mit gepulstem zeitlichem Verlauf, wie dies weiter unten noch ausführlich erläutert werden wird.

Zu diesem Zweck sind die hydraulischen Stecker 26 über ein Netzwerk von Verbindungskanälen und Öffnungen 49 am Boden der Mikroküvetten mit den Mikroküvetten 12 verbunden. Wenn alle Mikroküvetten 12 mit demselben Unterdruck beaufschlagt werden sollen, sind alle Verbindungskanäle parallel geschaltet und werden im hydraulischen Anschlußmodul 24 mit einer zentralen, gesteuerten Unterdruckquelle direkt verbunden. Wenn jedoch die einzelnen Mikroküvetten 12 mit jeweils individuellem Unterdruck angesteuert werden sollen, kann ebenfalls eine zentrale Unterdruckquelle verwendet werden, die an das Netzwerk von Verbin-

dungskanälen angeschlossen ist, wobei sich dann in diesen Verbindungskanälen individuell steuerbare Ventile befinden. Alternativ können aber in den Verbindungskanälen auch miniaturisierte Pumpen, insbesondere Miniatur-Membranpumpen, angeordnet sein, die individuell angesteuert werden. Die elektrische Ansteuerung der Ventile und/oder Miniaturpumpen kann entweder über das elektrische Anschlußmodul 16 oder das hydraulische Anschlußmodul 24 erfolgen. In jedem Fall führt eine Leitung 28 zum Ansteuern der vorerwähnten Elemente vom hydraulischen Anschlußmodul 24 zum Steuergerät 22.

Das Steuergerät 22 steht seinerseits mit einem Multiplexer 30 in Verbindung, um in vorbestimmter Weise mehrere Messungen gleichzeitig oder gegebenenfalls sequentiell durchführen zu können.

Wie man aus Fig. 2 erkennt, besteht die Platte 10 im wesentlichen aus drei Schichten. Auf der Unterschicht 32 befindet sich eine mittlere Schicht oder ein Substrat 34, das als Folie ausgebildet ist. Eine obere Schicht 36 ist als Mikrostrukturschicht ausgeführt. Die Unterschicht 32 besteht dabei vorzugsweise aus Glas. Das Substrat 34 ist vorzugsweise eine Polyimidfolie. Die Mikrostrukturschicht 36 besteht demgegenüber vorzugsweise aus Polymethylmethacrylat (PMMA).

In der Oberseite der Unterschicht 32 ist ein Verbindungskanal 38 ausgeführt. Der Verbindungskanal 38 dient zum individuellen Ansteuern der in Fig. 2 dargestellten Mikroküvette 12. Der Verbindungskanal 38 steht über einen vertikalen Kanal 40 im Substrat 34 mit einer Öffnung 49 am Boden 48 der Mikroküvette 12 in Verbindung. Die Mikroküvette 12 ist an ihrer Oberseite

mit einem zylindrischen Abschnitt 42 versehen, der mit einer Referenzelektrode 44 ausgekleidet ist. Die Referenzelektrode 44 ist an einen ersten elektrischen Anschluß 46 angeschlossen. Dieser liegt vorzugsweise auf Masse.

Unten an den zylindrischen Abschnitt 42 schließt sich ein trichterförmiger Abschnitt an, der den Boden 48 bildet, in dem die Öffnung 49 vorgesehen ist.

Eine Elektrode 50 ist näherungsweise ringförmig um das untere Ende des vertikalen Kanals 40 herum angeordnet. Sie ist zu diesem Zweck auf die Unterseite des Substrates 34 aufgebracht. Die Elektrode 50 ist an eine Zuleitung 52 angeschlossen, die zwischen Unterschicht 32 und dem Substrat 34 verläuft. Die Zuleitung 52 kann z.B. zusammen mit der Elektrode 50 auf die Unterseite des Substrates 34 aufgedruckt, aufgedampft, abgeschieden oder dergleichen sein. Die Zuleitung 52 ist mit einem zweiten elektrischen Anschluß 54 verbunden.

Die Elektroden 46 und 50 bestehen aus Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl). Derartige Elektroden werden in der Fachwelt als "reversibel" oder als "nicht polarisierbar" bezeichnet. Sie haben den Vorteil, daß an den Zellen nicht nur Wechselspannungsmessungen, also Messungen der Potentialspitzen (sog. "spikes"), sondern auch Gleichspannungsmessungen möglich sind. Sie können auch zur Strominjektion verwendet werden.

Zwischen den Elektroden 46 und 50 wird die Meßspannung U_{amp} gemessen. Ferner kann über den zweiten Anschluß 54 parallel zur Spannungsmessung ein Stimulationsstrom I_{st} eingespeist werden.

Dies wird weiter unten anhand von Fig. 4 noch näher erläutert werden.

Wie man aus der Draufsicht gemäß Fig. 3 erkennen kann, sind mehrere Elektroden 12 in der Platte 10 in Form eines Rasters angeordnet, wobei das Rastermaß d zwischen 0,1 und 10 mm, vorzugsweise bei etwa 9 mm liegt.

Die Mikroküvetten 12 haben im Bereich ihres zylindrischen Abschnitts 42 einen Innenradius r zwischen etwa 1 und 9 mm, vorzugsweise von etwa 7 mm, was eine leichte Befüllung erlaubt. Die lichte Weite x des vertikalen Kanals 40 beträgt weniger als 10 μm , vorzugsweise weniger als 5 μm .

Die Leiterbahnen 52 haben eine Breite b_1 zwischen 5 μm und 30 μm , vorzugsweise etwa 10 μm . Die Elektroden 50 sind in Draufsicht vorzugsweise quadratisch ausgebildet und haben eine Kantenlänge a zwischen 20 μm und 60 μm , vorzugsweise etwa 40 μm . Die Verbindungskanäle 38 haben eine Breite b_2 zwischen 10 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 20 μm .

Das Substrat 34 bzw. die Folie ist zwischen 2 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 5 μm dick.

Der Abstand l der Mikroküvetten 12 vom Rand der Platte 10 beträgt vorzugsweise mindestens 2 cm, wodurch ein hoher Shuntwiderstand, d.h. eine elektrische Entkopplung der einzelnen Elektroden erreicht wird.

Die Elektrode 50 und die Leiterbahnen 52 bestehen vorzugsweise aus Gold.

In Fig. 2 ist noch angedeutet, daß in den Verbindungskanal 38 eine Mikropumpe 56 integriert sein kann, die mittels eines dritten Anschlusses 58 ansteuerbar ist. Mittels der Mikropumpe 56 oder mittels einer zentralen Unterdruckquelle, gegebenenfalls unter Einschaltung von Ventilen in den Verbindungskanälen 38, kann ein Unterdruck mit gezieltem zeitlichem Verlauf in den Verbindungskanälen 38 eingestellt werden.

Fig. 4 zeigt in weiter vergrößertem Maßstab die Situation, wenn sich eine Zelle 60 auf dem Boden 48 der Mikroküvette 12 abgesenkt hat. Dies geschieht entweder durch Schwerkraft oder gezielt dadurch, daß durch Anlegen eines vorzugsweise konstanten Unterdrucks im Kanal 40 die Zelle 60 gezielt angesaugt wird. Die trichterförmige Gestalt des Abschnittes am Boden 48 der Mikroküvette 12 bewirkt darüber hinaus eine Vereinzelung der Zellen, so daß im Regelfall nur eine einzige Zelle 60 auf der Öffnung 49 am Boden 48 der Mikroküvette 12 über dem Kanal 40 liegen wird.

In Fig. 4 ist die Außenhaut oder Membran der Zelle 60 mit 62 und das Zellinnere mit 64 bezeichnet. Die Zelle 60 befindet sich in einer umgebenden Flüssigkeit 66, die in dem gezeigten Ausführungsbeispiel auch die Verbindungskanäle 38 und die Kanäle 40 ausfüllen kann und dort austauschbar ist. Sie liegt mit ihrer Unterseite 68 auf dem Boden 49 auf.

Sobald diese Position erreicht ist, wird im Verbindungskanal 38 ein Unterdruckimpuls erzeugt, wie in Fig. 4 mit einem Pfeil 70 angedeutet. Dieser Unterdruckimpuls 70 ist so bemessen, daß die Unterseite 68 aufgerissen und nach Art eines Kragens 72 in den Kanal 40 hineingestülpt wird. Das Zellinnere 64 steht dann

direkt mit dem Kanal 40 bzw. der darin befindlichen Flüssigkeit in Verbindung. Alternativ kann auch auf einen Unterdruckimpuls verzichtet werden und die Unterseite der Membran durch Zugabe von porenbildenden Substanzen, z.B. Nystatin oder Amphotericin B, durchlässig gemacht werden, so daß ein niederohmiger Zugang zum Zellinneren entsteht, jedoch keine größeren Moleküle hindurch diffundieren können.

In Fig. 4 ist ferner das elektrische Ersatzschaltbild der Zelle 60 eingezeichnet.

Mit R_M und C_M sind der Widerstand und die Kapazität der Membran 62 bezeichnet. R_s ist der Sealwiderstand, d.h. der Isolationswiderstand zwischen Zellinnerem 64 und Extrazellulärmedium 66 außerhalb der Zelle 60. R_p ist der Widerstand zwischen dem Zellinneren 64 und der Elektrode 50, während R_k der Widerstand zwischen Elektrode 50 und Referenzelektrode 44 ist.

Dadurch, daß der Kragen 72 sich in den Kanal 40 hineinstülpt und an der Wand 48 anliegt, ohne jedoch die relativ weit entfernte Elektrode 50 zu erreichen, hat R_s einen sehr hohen Wert ("Gigaseal").

Im stromlosen Zustand, wenn also über den Anschluß 54 und durch den Verbindungskanal 38 kein Strom fließt, entspricht die Spannung U_{amp} der an der Zellmembran anliegenden Membranspannung U_M . Kann hingegen über den Verbindungskanal ein endlicher Strom fließen, gilt die Beziehung:

$$U_{amp} = \frac{R_k}{R_k + R_p} U_M,$$

d.h. die Membranspannung U_M ist proportional zur Spannung U_{amp} .

Im Falle des Einleitens eines Stimulationsstromes I_{st} in den zweiten Anschluß 54 gilt für die Membranspannung U_M im stationären Zustand die Beziehung:

$$U_M = \frac{R_s \cdot R_M}{R_M + R_s} I_{st},$$

für den Fall, daß $R_k \gg R_p + R_s$, $R_m/(R_s + R_m)$ ist. Diese Bedingung wird erfindungsgemäß durch ausreichend lange Verbindungskanäle mit geringem Kanalquerschnitt erreicht.

Auf die vorstehend beschriebene Weise wird also die Zelle 60 am Boden 48 der Mikroküvette 12 sowohl hydraulisch als auch elektrisch kontaktiert, indem über die Elektrolytlösung der erforderliche Unterdruck und - durch zusätzliches Erzeugen eines Unterdruckimpulses 70 - der Öffnungsvorgang an der Zelle 60 bewirkt wird.

Vergleichsbeispiel

Um den Unterschied der erfindungsgemäßen Vorgehensweise zum Stand der Technik gemäß DE 197 12 309 A1 zu illustrieren, ist in Fig. 5 eine Darstellung ähnlich Fig. 4 gezeigt, die der bekannten Anordnung entspricht. Gleiche Elemente sind dabei mit gleichen Bezugszeichen versehen, wobei jeweils ein "a" hinzugefügt wurde.

Wie man aus Fig. 5 deutlich erkennt, liegt bei diesem Stand der Technik die Zelle 60a unmittelbar auf der Elektrode 50a auf. Die Zelle 60a wird daher von außen, d.h. von der Außenseite der Membran 62a, elektrisch beaufschlagt. Der Kanal 40a dient bei

diesem Stand der Technik ausschließlich dazu, durch Anlegen eines gewissen, geringen Unterdrucks die Zelle 60a an den Boden 48a anzuziehen und dort zu fixieren, wobei der Boden 48a im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung bei diesem Stand der Technik durch die Elektrode 50a gebildet wird.

Selbst wenn man bei diesem Stand der Technik über den Kanal 40a einen Unterdruckimpuls an die Zelle 60a legen und die Membran 62a öffnen würde (wovon in diesem Stand der Technik keine Rede ist), so würde sich ein Kragen 72a auf der Unterseite 68a der Zelle 60a bilden, der die Elektrode 50a im Bereich des Kanals 40a überdeckt. Trotz des Öffnens der Zelle 60a würde die Elektrode 50a somit immer noch keine direkte Messung durch das Zellinnere 64a ermöglichen, sondern auch weiterhin nur an der Außenseite der Membran 62a anliegen. Es würden daher die Messungen bei dieser Vorrichtung nach dem Stand der Technik auch bei einem Öffnen der Unterseite 68a der Zelle 60a nicht anders ablaufen als dort für den Fall beschrieben, bei dem der Unterdruck nicht zu einem Öffnen der Zelle 60a führt.

Beispiel 2

Schließlich zeigt Fig. 6 noch ein weiteres Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Mit 80 ist in Fig. 6 eine Platte bezeichnet, die von an sich herkömmlicher Bauart ist. Platten 80 dieser Art werden als "96-Loch-Platte" bezeichnet. Sie enthalten 96 im Raster angeordnete vertikale zylindrische Bohrungen 84. Diese Bohrungen 84 können als Mikroküvetten eingesetzt werden. Die Platte 80 kann, wie in

Fig. 6 rechts oben durch eine gestrichelte Linie angedeutet, auch mehrschichtig, insbesondere zweischichtig, aufgebaut sein.

Ein Boden 82 der zylindrischen Bohrungen oder Mikroküvetten 84 wird durch ein als Folie ausgebildetes Substrat 86 gebildet, das unten auf die Platte 80 geklebt, geschweißt oder sonstwie gebondet ist. Das Substrat 86 enthält jeweils im Zentrum des Bodens 82 einen Kanal 88, der als Loch ausgebildet ist.

Im Gegensatz zum erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel gemäß den Figuren 2 bis 4 befindet sich unterhalb des Substrates 86 kein Träger mit einem System von Verbindungskanälen. Statt dessen ist eine verfahrbare Hydraulik- und Meßeinheit 90 vorgesehen, die individuell von unten an die Unterseite 91 der Folie 86 herangeführt werden kann.

Die Einheit 90 umfaßt eine topfförmige Kammer 92, die an ihrer oberen Stirnseite mit einer Ringdichtung 94 versehen ist. Auf diese Weise kann die Kammer 92 dicht an die Unterseite 91 angesetzt werden, und zwar derart, daß die Vertikalachse der Kammer 92 mit der Achse jeweils eines Lochs 88 fluchtet.

Von der Kammer 92 führt eine Rohrleitung 96 zu einer nicht dargestellten Unterdruckeinheit. Auf diese Weise kann in der Kammer 92 ein Unterdruckimpuls erzeugt werden, wie mit einem Pfeil 98 angedeutet.

Am Boden der Kammer 92 ist eine Elektrode 100 angeordnet, die mit einem externen Anschluß 102 verbunden ist.

Mit 104 ist eine mehrachsige Verfahreinheit angedeutet. Die Verfahreinheit 104 gestattet es, die Hydraulik- und Meßeinheit 90 an der Unterseite 91 entlang zu führen, und zwar von Mikroküvette 84 zu Mikroküvette 84, um jeweils die Einheit 90 dann von unten dicht um das jeweilige Loch 88 herum an die Unterseite 91 anzupressen. Durch Beaufschlagen der Rohrleitung 96 mit einem Unterdruckimpuls 98 kann dann das gleiche Experiment durchgeführt werden, wie es weiter oben anhand Fig. 4 zum ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung erläutert wurde.

Das erste Ausführungsbeispiel der Erfindung gemäß den Figuren 2 bis 4 hat den Vorteil, daß eine kompakte Platte mit sämtlichen Verbindungskanälen zum Ansteuern der Mikroküvetten 12 zur Verfügung steht, so daß ohne weitere Betätigungseinrichtungen, lediglich durch Ansteuern von Ventilen, Kontakten und dergleichen eine Vielzahl von Messungen sequentiell oder im Multiplex-Betrieb durchgeführt werden kann.

Das zweite Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 6 hat demgegenüber den Vorteil, daß eine handelsübliche Platte eingesetzt werden kann und daß der Aufwand für eine Unterschicht mit einer Vielzahl von Verbindungskanälen, Leiterbahnen und einzelnen Elektroden gespart wird.

Beispiel 3

In den Fig. 7a) bis c) ist ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung äußerst schematisch dargestellt, das im folgenden näher erläutert wird.

Wied rum ist ein Substrat 110 vorgesehen, das beispielsweise aus einer Polyimid-Folie bestehen kann. In dem Substrat 110 ist eine Mehrzahl von Kanälen ausgebildet, von denen einer, der mit der Ziffer 122 bezeichnet ist, dargestellt ist. Oberhalb des Substrates 110 befindet sich eine Flüssigkeit, in der Zellen 112 vorhanden sind. Unterhalb des Kanals 122 ist eine Kammer 124 gebildet, die mit dem Kanal 122 kommuniziert und an deren Boden ähnlich wie bei der Ausführung gemäß Fig. 6 eine Elektrode 126 vorgesehen ist.

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Ausführungen steht diese Kammer 124 jedoch nicht nur mit einem Verbindungskanal, sondern mit zwei Verbindungskanälen 130, 132, in Verbindung. Diese Verbindungskanäle 130, 132 sind über Ventile 118, 120 mit Flüssigkeitsreservoirs F_1 und F_2 verbindbar.

Es versteht sich, daß die Darstellung rein schematisch ist und daß die Verbindungskanäle 130, 132 z.B. in einer photopolimerisierbaren Schicht ausgebildet sein können und daß die Ventile vorzugsweise an den äußeren Enden der Kanäle ausgebildet sind.

Ist nun, wie in Fig. 7a) dargestellt, das Ventil 120 geschlossen und das Ventil 118 geöffnet, so führt das Anlegen eines Druckes P_1 an den Kanal 130, der geringer ist als der Druck P_0 in der Flüssigkeit 114 zur Ausbildung einer Strömung in Richtung des Pfeiles 133 durch den Kanal 122 und den Zuführkanal 130. Dies führt dazu, daß die Zelle 112 angesaugt wird und sich auf die Oberfläche 128 des Substrates 110 oberhalb der Öffnung des Kanals 122 aufsetzt und bei Aufrechterhaltung des Unterdruckes ein Megaseal ausbildet, so daß sich die Cell-Attached-Konfiguration einstellt.

Wird nunmehr gemäß Fig. 7b) das Ventil 120 geöffnet, wobei die Beziehung $P_1 < P_2 < P_0$ eingehalten wird, so füllt sich die Kammer 124 mit intrazellulärem Medium aus dem Flüssigkeitsreservoir F_2 , während sich eine Strömung in Richtung des Pfeiles 134 aus dem Verbindungskanal 132 durch die Kammer 124 in den Zuführkanal 130 einstellt. Hierbei muß der Druck P_2 größer als der Druck P_1 sein, damit die Strömung in Richtung des Pfeiles 134 aus dem Verbindungskanal 132 zum Verbindungskanal 130 gerichtet ist; ferner müssen beide Drücke P_1 und P_2 geringer als der Druck P_0 in dem Extrazellulärmedium 114 sein, von dem die Zelle 112 umgeben ist.

Nunmehr wird in der nachfolgenden Phase gemäß Fig. 7c) das Ventil 118 geschlossen und ein pulsartiger Unterdruck an den Verbindungskanal 132 angelegt, so daß P_2 sehr viel kleiner als P_0 wird ($P_2 \ll P_0$). Dadurch wird die Unterseite der Membran der Zelle 112, der Membranpatch, angesaugt und infolge der Unterdruckstöße aufgebrochen, so daß sich nunmehr ein Whole-Cell-Patch-Clamp einstellt. Die Strömung erfolgt während dieser Phase in Richtung des Pfeiles 135 durch den Kanal 122 und den Verbindungskanal 132 zum Flüssigkeitsreservoir F_2 hin. Es wird nunmehr ein Zustand erreicht, in dem die Kammer 124 ausschließlich mit Intrazellulärmedium 116 gefüllt ist. Anschließend kann über das Ventil 118 wieder mit einem anderen Medium gearbeitet werden, sofern dies für die durchzuführenden Messungen erwünscht ist.

Der Vorteil dieser Anordnung und dieses Verfahrens liegt darin, daß mit genau kontrolliertem Intrazellulärmedium gearbeitet werden kann, dessen Zusammensetzung beeinflusst werden kann oder

daß sogar ein and res Intrazellulärmedium verwendet werden kann.

Diese Ausführung mit zwei oder mehr Verbindungskanälen, die über Ventile steuerbar sind, ist grundsätzlich sowohl mit der Ausführung kombinierbar, die zuvor anhand der Fig. 1 bis 4 erläutert wurde, als auch mit der Ausführung gemäß Fig. 6.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen an in einer flüssigen Umgebung (66) befindlichen Zellen (60; 112), bei dem jede Zelle (60; 112) mit einer Unterseite (68) ihrer Membran (62) auf einer Oberfläche (48; 82; 128) positioniert wird, die von mindestens einem Kanal (40; 88; 122) durchsetzt ist, an dem zum Ansaugen der Zelle (60; 112) an die Oberfläche (48; 82; 128) ein Druckgefälle (70) eingestellt wird und die Zelle (60; 112) über mindestens eine Elektrode (44, 50; 100; 126) elektrisch abgefragt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Unterseite (68) der Membran (62) durch eine Erhöhung des Druckgefälles aufgerissen wird und/oder die Membran (62) durch Zugabe von porenbildenden Substanzen oder durch einen elektrischen Stromimpuls mikroporös und elektrisch niederohmig gemacht wird oder aufgerissen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Druckgefälle zum Aufreißen der Membran (62) pulsartig erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Positionierung der Zelle (60) ein Boden (48; 82) einer Mikroküvette (12; 84) verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle (60; 112) über eine von der Unterseite (68) der Membran (62) in Richtung des Kanals (40; 88; 122) räumlich beabstandete Elektrode (50; 100; 126) elektrisch abgefragt wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Strom (I_{st}) durch das Zellinnere (64) geleitet wird oder eine Potentialmessung ausgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Anordnung mit einer Vielzahl von Kanälen (40; 88; 122) der Impuls (70) zur Erhöhung des Druckgefälles oder der elektrische Stromimpuls zum Öffnen der Membranfläche (68) gleichzeitig an allen Kanälen (40; 88; 122) erzeugt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Anordnung mit einer Vielzahl von Kanälen (40; 88; 122) der Impuls (70; 98) zur Erhöhung des Druckgefälles oder der elektrische Stromimpuls zum Öffnen der Membranfläche (68) nacheinander an ausgewählten einzelnen oder mehreren Kanälen (40; 88; 122) erzeugt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung des intrazellulären flüssigen Mediums (116) durch Zugabe von Substanzen verändert wird oder daß das intrazelluläre flüssige Medium (116) ausgetauscht wird.
9. Vorrichtung zum elektrischen Messen an Zellen (60; 112) in flüssiger Umgebung (66), mit einem Substrat (34; 86), das von einem Kanal (40; 88; 122) durchsetzt ist, oberhalb dessen eine Zelle (60; 112) mit einer Unterseite (68) ihrer Membran (62) auf einer Oberfläche (49; 85;

128) des Substrates (34; 86) positionierbar ist, wobei Mittel (56) zum Erzeugen eines Druckgefälles (70) entlang des Kanals vorgesehen sind und eine erste Elektrode (44) zur elektrischen Abfragung der Zelle (60; 112) vorgesehen ist, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine zweite Elektrode (50; 100; 126) von der ersten Elektrode (44) in Richtung des Kanals (40; 88; 122) beabstandet angeordnet ist.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel (56, 58) zur Steuerung des Druckgefälles (70) vorgesehen sind, sowohl zur Erzeugung eines statischen Druckgefälles (70) zur Einstellung einer Cell-Attached-Konfiguration, als auch zur pulsartigen Erhöhung des Druckgefälles (70) zum Aufreißen der Unterseite (68) der Membran (62).
11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Elektrode (50) an dem von der ersten Elektrode (44) abgewandten Ende des Kanals (40) angeordnet ist.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Elektrode (50) das abgewandte Ende des Kanals (40) ringförmig umgibt.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Kanal (122) an seinem der ersten Elektrode (44) abgewandten Ende über Ventile (118, 120) mit einer Mehrzahl von Kanälen (130, 132) verbunden ist, über die Flüssigkeit (F_1 , F_2) zu- oder abführbar ist.

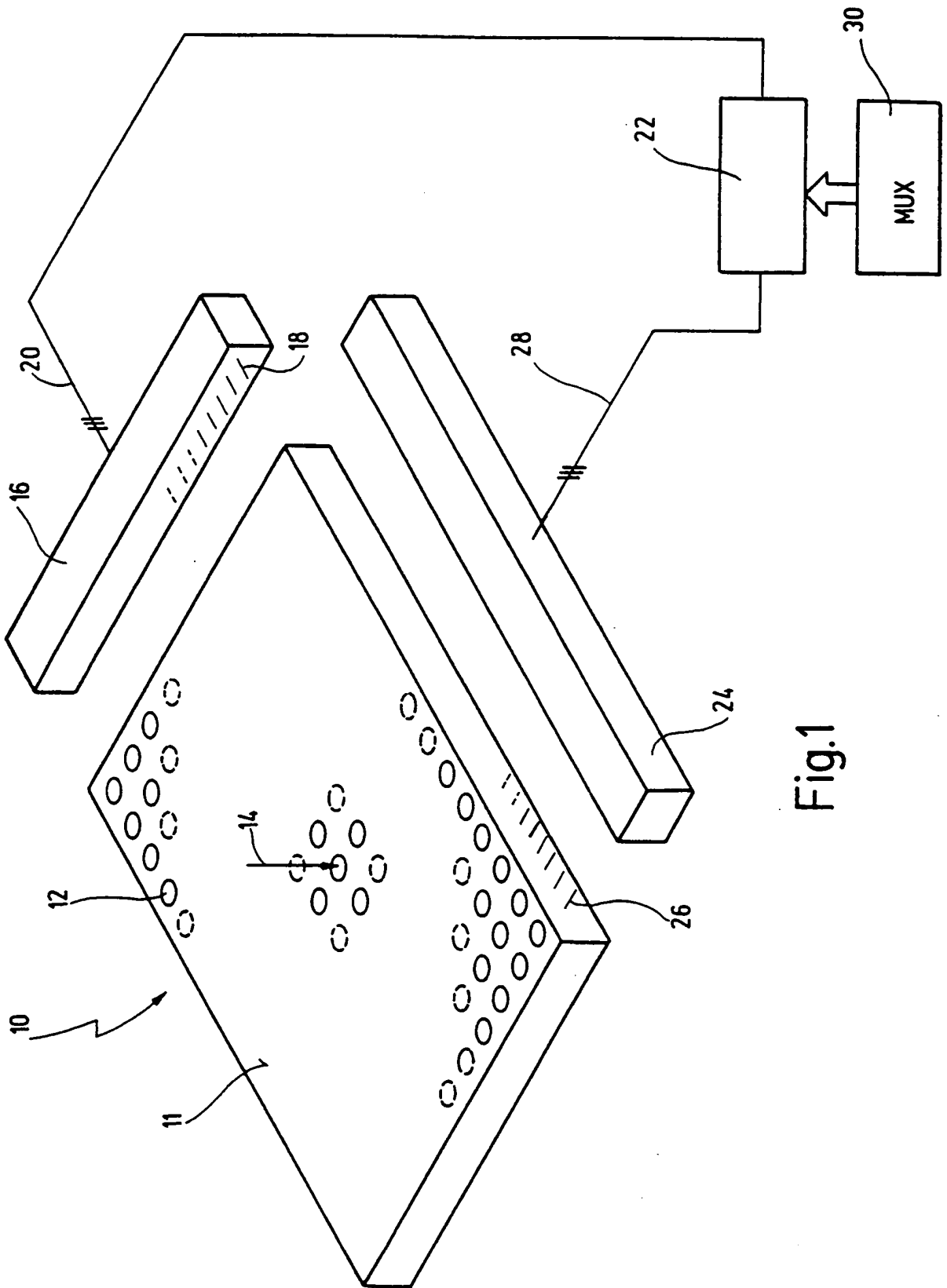
14. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von Kanälen (40; 88; 122) in einem gemeinsamen Substrat (34; 86; 110) angeordnet ist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß über dem Substrat (34; 86) eine Mikroküvette (12; 84) angeordnet ist, in deren Boden (48; 82) eine Öffnung (49; 88) vorgesehen ist.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Kanal (40; 88; 122) eine lichte Weite (x) von weniger als 10 μm , vorzugsweise weniger als 5 μm aufweist.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von Mikroküvetten (12; 84) in einer Platte (10; 80) angeordnet sind.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Platte (12; 80) mehrschichtig aufgebaut ist.
19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Platte (10) eine obere Schicht (36), eine mittlere Schicht und eine Unterschicht (32) umfaßt, wobei in der oberen Schicht (36) die Mikroküvetten (12) angeordnet sind, die mittlere Schicht das Substrat (34) bildet, in dem die Kanäle (40) angeordnet sind und die Unterschicht (32) Verbindungskanäle (38) enthält, die zu den Kanälen (40) führen.

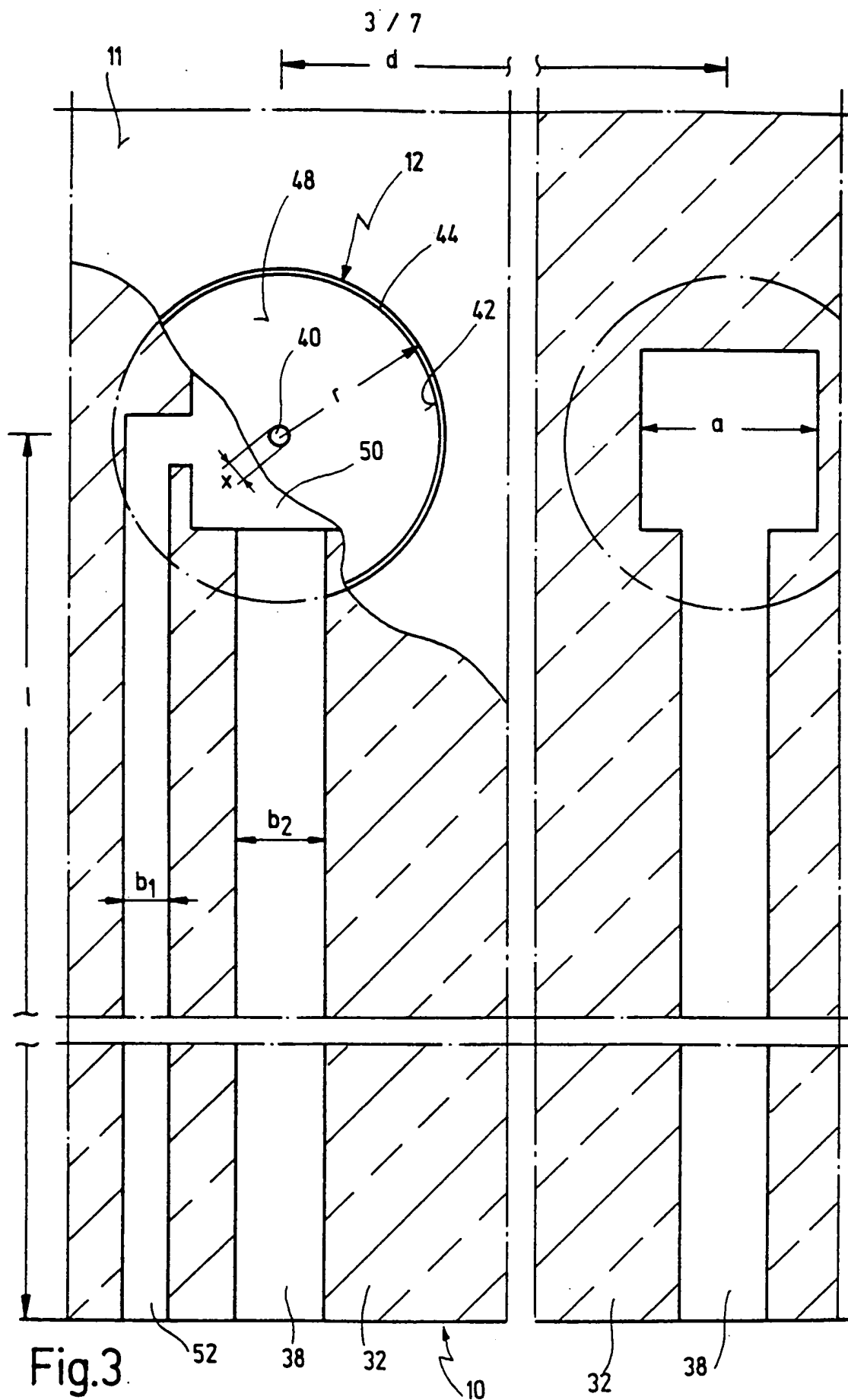
20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (34; 86) mit einer Unterschicht (32) verbunden ist, die aus einer oder mehreren Schichten aus photostrukturierbaren Materialien besteht, die Verbindungskanäle (38) aufweisen, die zu den Kanälen (40; 88; 122) führen.
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Unterschicht (32) auf einen Glasträger aufgebracht ist.
22. Vorrichtung nach Anspruch 19, 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungskanäle (38) eine Breite (b_2) zwischen 10 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 20 μm aufweisen.
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (50) auf der Unterseite des Substrates (34) oder auf der Oberseite der Unterschicht (32) angeordnet sind.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (50) eine quadratische Fläche mit einer Kantenlänge (a) zwischen 20 μm und 60 μm , vorzugsweise etwa 40 μm aufweisen.
25. Vorrichtung nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß zu den Elektroden (50) führende Leiterbahnen (52) zwischen dem Substrat (34) und der Unterschicht (32) angeordnet sind.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Leiterbahnen (52) eine Breite (b_1) zwischen 5 μm und 30 μm , vorzugsweise etwa 10 μm aufweisen.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest die obere Schicht (36), die Unterschicht (32) oder das Substrat (34) unabhängig voneinander aus Kunststoff, insbesondere aus Polymethylmethacrylat (PMMA), Silikon, PTFE, Polyimid oder aus einem anorganischen Material, insbesondere aus Silizium, Keramik oder Glas bestehen.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (34; 86) eine Schichtdicke von 2 μm und 40 μm , vorzugsweise etwa 5 μm aufweist.
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (34; 86) aus einer Folie besteht, in der eine Mehrzahl von Kanälen (40; 88) als Bohrungen ausgebildet ist.
30. Vorrichtung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (86) an der Unterseite einer Platte (80) angeordnet ist, in der eine Mehrzahl von Bohrungen als Mikroküvetten (84) ausgebildet ist, deren Boden (82) durch das Substrat (86) gebildet ist, in dem die Kanäle (88) als Löcher ausgebildet sind.
31. Vorrichtung nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (86) an der Unterseite einer

Platte (36) angeordnet ist, in der eine Mehrzahl von Bohrungen als Mikroküvetten (12) ausgebildet ist, in deren Boden (48) Löcher (49) vorgesehen sind, mit denen die Kanäle (40) des Substrates (34) zentriert sind.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß eine Hydraulik- und Meßeinheit (90) vorgesehen ist, die eine zur Unterseite des Substrates (86; 110) hin offene Kammer (92; 124) aufweist, die an der Unterseite des Substrates (86; 110) derart positionierbar ist, daß die Kammer (92; 124) mit einem ausgewählten Kanal (88; 122) kommuniziert und nach außen abgedichtet ist, wobei die Kammer (92; 124) mindestens eine Elektrode (100; 126) enthält und mit mindestens einem Anschlußkanal (96; 130, 132) verbindbar ist, der mit einer Unterdruckquelle verbunden ist.
33. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer (124) mit einer Mehrzahl von Anschlußkanälen (130; 132) über Ventile (118, 120) verbunden ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verfahreinheit (104) zum Verfahren und Positionieren der Platte (80) und der Hydraulik- und Meßeinheit (90) relativ zueinander vorgesehen ist.





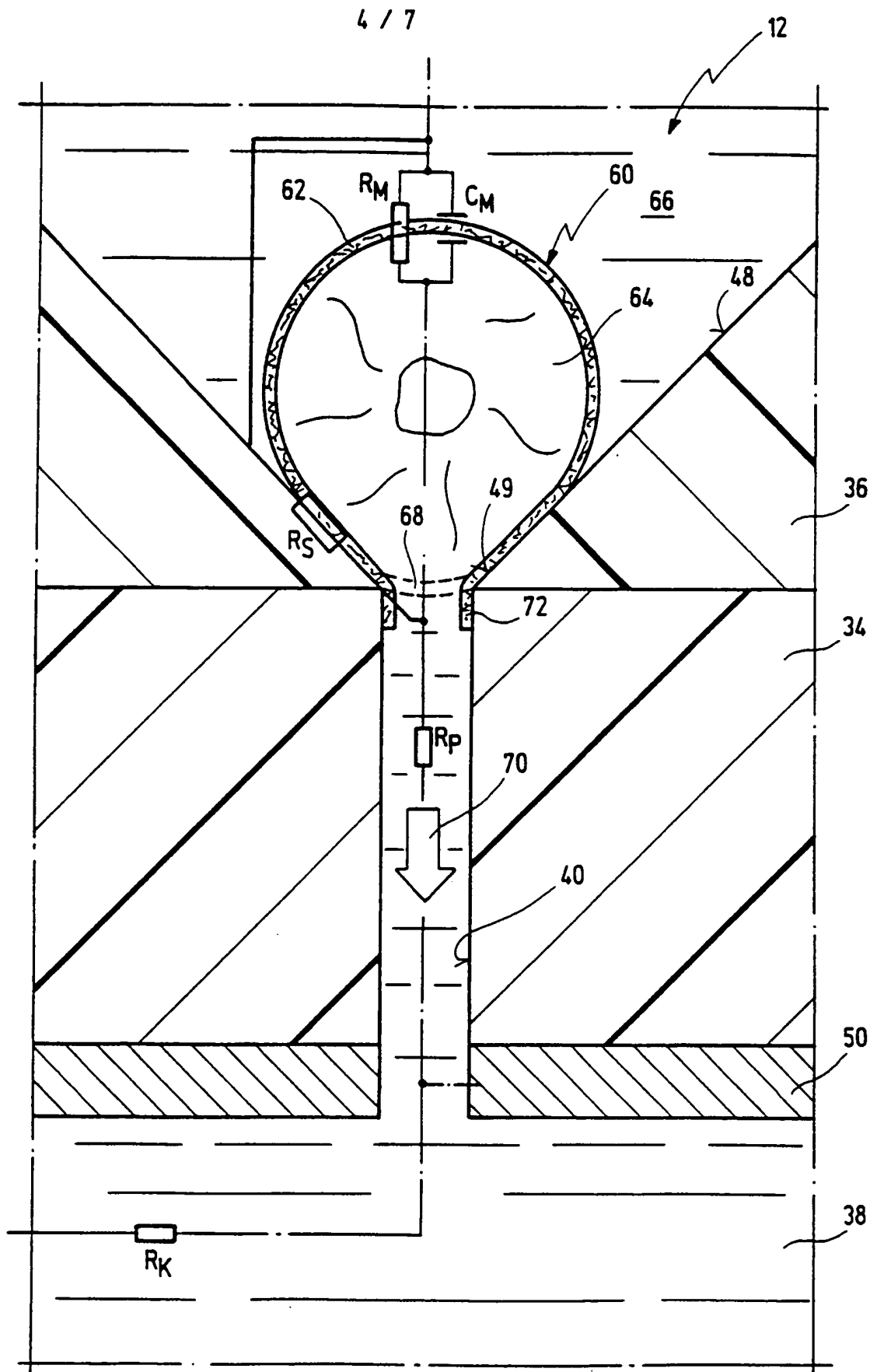


Fig.4

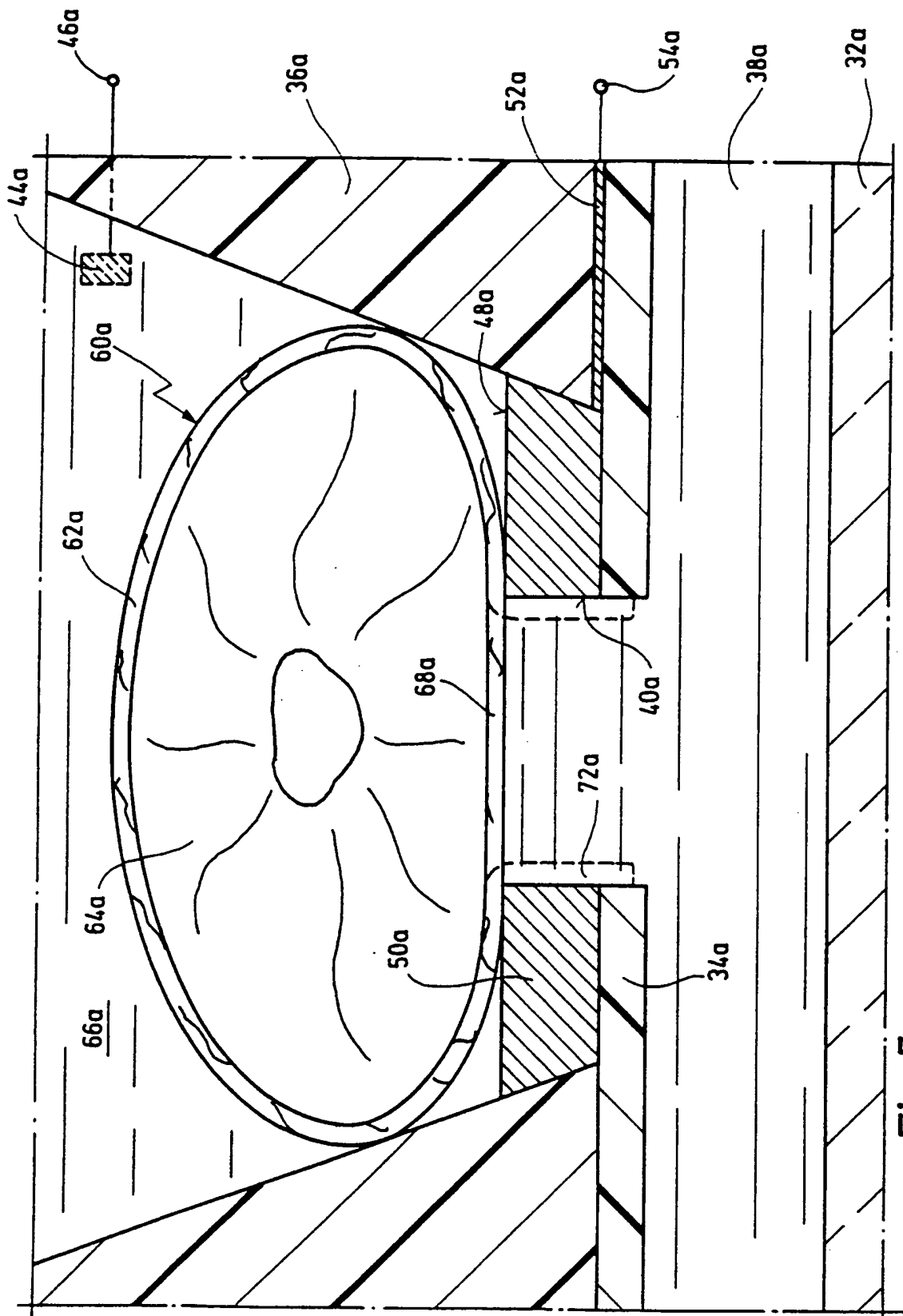


Fig. 5

STAND DER TECHNIK

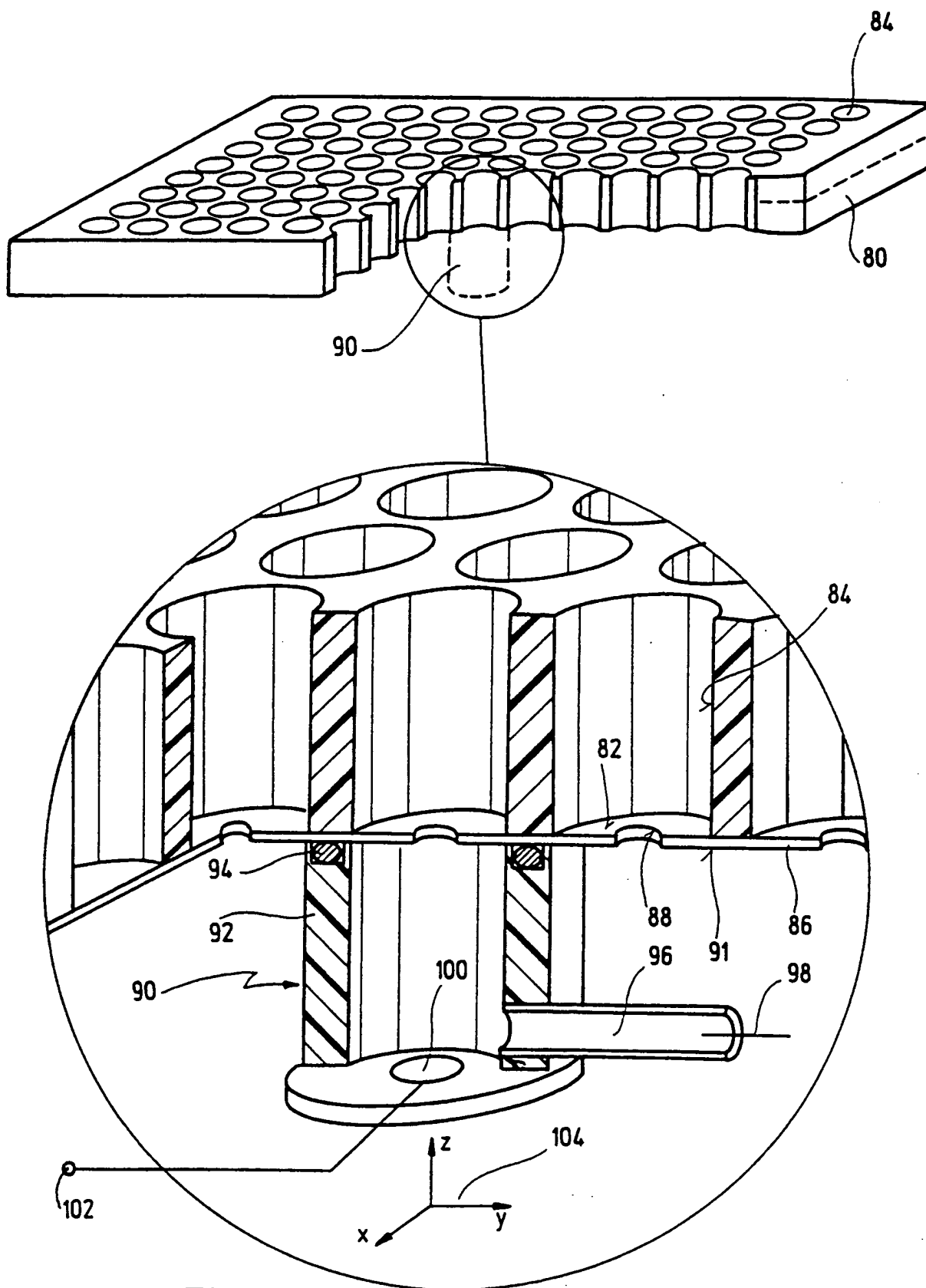


Fig.6

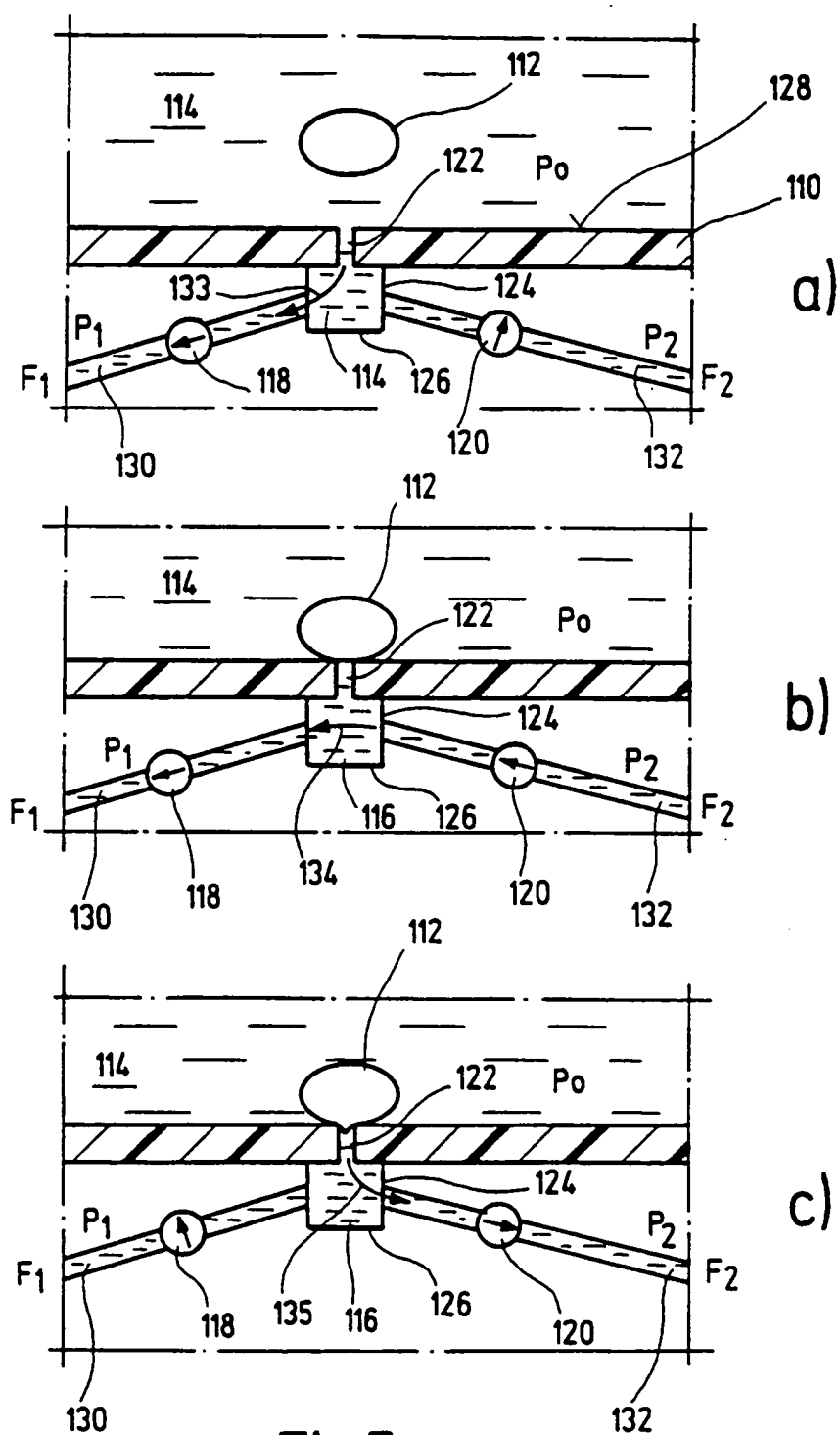


Fig.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N33/487 G01N27/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	<p>DE 198 41 337 C (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 23 September 1999 (1999-09-23)</p> <p>column 2, line 20 - line 48 column 3, line 8 - line 12 column 3, line 27 - line 44 column 4, line 27 - line 47 column 5, line 35 - line 41 column 6, line 33 - line 41 column 7, line 32 - line 51 column 8, line 36 - line 65 column 11, line 4 - line 23 column 12, line 28 - line 56</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>9-12</p> <p>1-8, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 27</p>



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

12/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stussi, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08895

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	E. NEHER AND B. SAKMANN: "Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers" NATURE, vol. 260, 1976, pages 799-802, XP000943702 London column 1 -column 2; figure 1 ----	1,2,4-8
X,P	DE 198 27 957 A (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 9 December 1999 (1999-12-09) column 1 -column 4 column 6, line 39 - line 50 column 15, line 68 -column 16, line 42; figure 22 ----	1,2,4,5, 8-12
Y	DE 197 12 309 A (NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN) 20 May 1998 (1998-05-20) cited in the application column 4, line 1 - line 10 column 5, line 48 - line 55 figures 1-3 ----	3,15,17, 18,20, 21,23,27
A	US 5 262 128 A (LEIGHTON STEPHEN B ET AL) 16 November 1993 (1993-11-16) column 2, line 5 - line 41 column 3, line 54 - line 65 column 4, line 25 - line 34 column 4, line 56 -column 5, line 59 ----	13-34
A	WO 97 05922 A (NISCH WILFRIED ;NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN (DE)) 20 February 1997 (1997-02-20) cited in the application the whole document ----	1-34
A	EP 0 627 621 A (AVL MEDICAL INSTR AG) 7 December 1994 (1994-12-07) the whole document ----	1-34
A	EP 0 689 051 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 December 1995 (1995-12-27) the whole document ----	1-34
A	DE 196 46 505 A (ITT IND GMBH DEUTSCHE) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document -----	13-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19841337 C	23-09-1999	EP 0962524 A JP 11346764 A DE 19827957 A EP 0960933 A JP 11346794 A	08-12-1999 21-12-1999 09-12-1999 01-12-1999 21-12-1999
DE 19827957 A	09-12-1999	DE 19841337 C EP 0962524 A EP 0960933 A JP 11346764 A JP 11346794 A	23-09-1999 08-12-1999 01-12-1999 21-12-1999 21-12-1999
DE 19712309 A	20-05-1998	WO 9822819 A EP 0938674 A	28-05-1998 01-09-1999
US 5262128 A	16-11-1993	AU 6640190 A EP 0497885 A WO 9105519 A	16-05-1991 12-08-1992 02-05-1991
WO 9705922 A	20-02-1997	DE 19529371 A EP 0844896 A JP 11511248 T US 6032062 A	13-02-1997 03-06-1998 28-09-1999 29-02-2000
EP 0627621 A	07-12-1994	JP 2641400 B JP 7218510 A US 5489515 A DE 59306529 D	13-08-1997 18-08-1995 06-02-1996 26-06-1997
EP 0689051 A	27-12-1995	CN 1131744 A JP 8062209 A KR 150390 B US 5563067 A	25-09-1996 08-03-1996 01-10-1998 08-10-1996
DE 19646505 A	14-05-1998	DE 59702254 D WO 9820974 A EP 0938383 A	28-09-2000 22-05-1998 01-09-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08895

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/487 G01N27/403

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X Y	DE 198 41 337 C (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 23. September 1999 (1999-09-23) Spalte 2, Zeile 20 - Zeile 48 Spalte 3, Zeile 8 - Zeile 12 Spalte 3, Zeile 27 - Zeile 44 Spalte 4, Zeile 27 - Zeile 47 Spalte 5, Zeile 35 - Zeile 41 Spalte 6, Zeile 33 - Zeile 41 Spalte 7, Zeile 32 - Zeile 51 Spalte 8, Zeile 36 - Zeile 65 Spalte 11, Zeile 4 - Zeile 23 Spalte 12, Zeile 28 - Zeile 56 --- -/-	9-12 1-8, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stussi, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08895

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	E. NEHER AND B. SAKMANN: "Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers" NATURE, Bd. 260, 1976, Seiten 799-802, XP000943702 London Spalte 1 -Spalte 2; Abbildung 1 ---	1,2,4-8
X,P	DE 198 27 957 A (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) Spalte 1 -Spalte 4 Spalte 6, Zeile 39 - Zeile 50 Spalte 15, Zeile 68 -Spalte 16, Zeile 42; Abbildung 22 ---	1,2,4,5, 8-12
Y	DE 197 12 309 A (NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN) 20. Mai 1998 (1998-05-20) in der Anmeldung erwähnt Spalte 4, Zeile 1 - Zeile 10 Spalte 5, Zeile 48 - Zeile 55 Abbildungen 1-3 ---	3,15,17, 18,20, 21,23,27
A	US 5 262 128 A (LEIGHTON STEPHEN B ET AL) 16. November 1993 (1993-11-16) Spalte 2, Zeile 5 - Zeile 41 Spalte 3, Zeile 54 - Zeile 65 Spalte 4, Zeile 25 - Zeile 34 Spalte 4, Zeile 56 -Spalte 5, Zeile 59 ---	13-34
A	WO 97 05922 A (NISCH WILFRIED ;NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN (DE)) 20. Februar 1997 (1997-02-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-34
A	EP 0 627 621 A (AVL MEDICAL INSTR AG) 7. Dezember 1994 (1994-12-07) das ganze Dokument ---	1-34
A	EP 0 689 051 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27. Dezember 1995 (1995-12-27) das ganze Dokument ---	1-34
A	DE 196 46 505 A (ITT IND GMBH DEUTSCHE) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument -----	13-34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung ..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08895

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19841337 C	23-09-1999	EP 0962524 A	08-12-1999
		JP 11346764 A	21-12-1999
		DE 19827957 A	09-12-1999
		EP 0960933 A	01-12-1999
		JP 11346794 A	21-12-1999
DE 19827957 A	09-12-1999	DE 19841337 C	23-09-1999
		EP 0962524 A	08-12-1999
		EP 0960933 A	01-12-1999
		JP 11346764 A	21-12-1999
		JP 11346794 A	21-12-1999
DE 19712309 A	20-05-1998	WO 9822819 A	28-05-1998
		EP 0938674 A	01-09-1999
US 5262128 A	16-11-1993	AU 6640190 A	16-05-1991
		EP 0497885 A	12-08-1992
		WO 9105519 A	02-05-1991
WO 9705922 A	20-02-1997	DE 19529371 A	13-02-1997
		EP 0844896 A	03-06-1998
		JP 11511248 T	28-09-1999
		US 6032062 A	29-02-2000
EP 0627621 A	07-12-1994	JP 2641400 B	13-08-1997
		JP 7218510 A	18-08-1995
		US 5489515 A	06-02-1996
		DE 59306529 D	26-06-1997
EP 0689051 A	27-12-1995	CN 1131744 A	25-09-1996
		JP 8062209 A	08-03-1996
		KR 150390 B	01-10-1998
		US 5563067 A	08-10-1996
DE 19646505 A	14-05-1998	DE 59702254 D	28-09-2000
		WO 9820974 A	22-05-1998
		EP 0938383 A	01-09-1999